

Universitätsspital Zürich  
Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Klinische Ernährung  
Direktor: Prof. Dr. med. Giatgen Spinas  
Departement für Innere Medizin

---

Arbeit unter der Leitung von  
Herrn Prof. Dr. med. Giatgen Spinas, Universität Zürich und  
Herrn Prof. Dr. med. Christoph Beglinger, Universität Basel

## **Vergleich von oraler Verabreichung eines Ghrelinagonisten mit und ohne Nahrung**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von  
Anna Tina Casanova  
von Ruschein GR

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. Giatgen Spinas  
Zürich 2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	3
<b>2. Einleitung</b>	5
2.1 Eigenschaften der „growth hormone secretagogues“ (GHS)	5
2.2 Ghrelin	6
2.3 Wachstumshormon	6
2.4 ARD-07	7
2.5 Anwendungsmöglichkeiten von ARD-07	8
<b>3. Zielsetzung der Arbeit</b>	9
3.1 primäres Ziel	9
3.2 sekundäre Ziele	9
<b>4. Methodik</b>	10
4.1 Versuchspersonen	10
4.2 Studiendesign	11
4.3 Versuchsablauf	11
4.4 Material	12
4.4.1 ARD-07-Applikation	12
4.4.2 Blutentnahmen und Behandlung der Blutproben	13
4.5 Bestimmungen	13
4.5.1 ARD-07-Bestimmung	13
4.5.2 GH-Bestimmung	13
4.5.3 IGF-1-Bestimmung	14
4.5.4 Glukose-Bestimmung	14
<b>5. Statistik</b>	15
5.1 Pharmakokinetik	15
5.2 Statistische Analysen	15
<b>6. Resultate</b>	16
6.1 ARD-07-Plasmakonzentrationen	16
6.2 GH-Plasmakonzentrationen	18
6.3 Plasma-Glukosekonzentrationen	19
6.4 IGF-1-Plasmakonzentrationen	20
6.5 Unerwünschte Nebenwirkungen von ARD-07	20
<b>7. Diskussion</b>	21
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	24
<b>9. Anhang</b>	28
9.1 Probandeninformation und Einwilligung	28
9.2 Screeningformular	31
9.3 Tabellen 1-3: Resultate Statistik	32
9.4 Danksagung	34
<b>10. Curriculum vitae</b>	35

# **1. Zusammenfassung**

## **Hintergrund und Fragestellung:**

Ghrelin ist ein Polypeptid aus 28 Aminosäuren, welches von den entero-endokrinen Zellen der Magenschleimhaut sezerniert wird. Seine Konzentration steigt im Nüchternzustand an und vermindert sich nach der Nahrungsaufnahme. Ghrelin hat im Wesentlichen zwei Wirkungen: einerseits stimuliert und moduliert es die Freisetzung von Wachstumshormon (GH), andererseits regt es den Appetit an. Auf Grund des Einflusses auf die GH-Sekretion wird es zur Gruppe der growth hormone secretagogues (GHS) gezählt. Die in dieser Studie verwendete Testmedikation, ARD-07, ist ein synthetisches Analog von Ghrelin; sie weist dieselbe Wirkung auf den GHS-Rezeptor wie endogenes Ghrelin auf.

Eine orale Verabreichung von ARD-07 zeigt in vielen therapeutischen Situationen einen grossen Vorteil gegenüber einer i.v. Applikation. Primäres Ziel der vorliegenden Studie war es, den Effekt einer gleichzeitigen Mahlzeit auf die Bioverfügbarkeit einer einmaligen oralen Dosis ARD-07 zu untersuchen, da die Testmedikation ARD-07 möglicherweise pharmakologisch Verwendung finden könnte und eine Veränderung der Resorption sich auf die Dosierung auswirkt. Darüber hinaus haben wir die generelle Verträglichkeit, die Pharmakokinetik sowie den Einfluss auf die GH-Sekretion untersucht.

## **Methodik:**

Die Studie wurde als randomisierte Phase I, open label, cross-over, Einzeldosis-Studie angelegt. An zwei unterschiedlichen Versuchstagen wurde an insgesamt 16 gesunde Versuchspersonen (8 männliche und 8 weibliche) eine einmalige Dosis ARD-07 verabreicht, einmal mit und einmal ohne gleichzeitiger Testmahlzeit. Regelmässige Blutentnahmen wurden durchgeführt mit Bestimmung des Verlaufs der Plasmakonzentrationen von growth hormone (GH), IGF-1, Glukose und ARD-07.

## **Resultate:**

Die aus den Blutentnahmen ermittelten ARD-07-Plasmakonzentrationen lassen erkennen, dass eine rasche Resorption der Test-Substanz stattgefunden hat. Die Menge an resorbiertem ARD-07 ist stark abhängig von der Applikationsform. So beträgt diese fast das Doppelte wenn sie ohne Mahlzeit verabreicht wird (Mittelwert  $\pm$  SEM:  $27.8 \pm 4.1$  ng/ml) als mit gleichzeitiger Nahrungsaufnahme ( $13.7 \pm 1.2$  ng/ml,  $p=0.002$ ). Die maximalen ARD-07-Plasmakonzentrationen waren ebenfalls mehr als Doppelt so hoch ohne gleichzeitige Nahrungszufuhr ( $10.6 \pm 1.6$  ng/ml) im Vergleich zu den entsprechenden Werten mit Nahrungsaufnahme ( $4.4 \pm 0.5$  ng/ml,  $p=0.001$ ).

Die höchsten GH-Plasmakonzentrationen wurden ohne Mahlzeit signifikant früher erreicht (nach 60 min. im Vergleich zur Verabreichung mit Mahlzeit nach 210 min.,  $p=0.001$ ) und waren um ein Vielfaches höher ( $37.1 \pm 5.3$  ng/ml) als mit Mahlzeit ( $13.0 \pm 3.5$  ng/ml,  $p=0.001$ ).

Die IGF-1-Plasmakonzentrationen waren in beiden Versuchsreihen vergleichbar.

Im Versuchsteil mit Nahrung konnte ein signifikanter Anstieg der Plasma-Glukosekonzentrationen verzeichnet werden, ohne Nahrungseinnahme erfolgte hingegen kein Anstieg der Glukosespiegel.

## **Schlussfolgerungen:**

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die Resorption und die maximale Plasmakonzentration von ARD-07 wesentlich von der Applikationsform abhängen. So haben wir festgestellt, dass die Resorption um gut die Hälfte vermindert ist, falls zeitgleich zur Substanzeinnahme Nahrung zugeführt wird. Dieses Erkenntnis ist wichtig in Hinblick auf einen potentiellen pharmakologischen Einsatz eines synthetischen Ghrelinagonisten wie ARD-07.

## 2. Einleitung

### 2.1 Eigenschaften der „growth hormone secretagogues“ (GHS)

Hypothalamische Hormone regulieren die pulsatile Freisetzung von Wachstumshormon („growth hormone“ oder GH) aus dem Hypophysenvorderlappen. Seit der Entdeckung dieser Hormone vor mehr als 30 Jahren wurden verschiedene Peptid- und nicht-Peptid-Analoga synthetisiert und geprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass viele dieser Analoga die GH-Freisetzung stimulieren und/oder modulieren können. Sie werden deshalb als Wachstumshormon-stimulierende Moleküle oder growth hormone secretagogues (GHS) bezeichnet. Ihre GH-stimulierende Wirkung verüben sie durch Bindung an die hauptsächlich in der Hypophyse und im Hypothalamus vorhandenen GHS-Rezeptoren [1, 2]. Inzwischen ist die Struktur der GHS-Rezeptoren bekannt und geklont. Auch wurden endogene Agonisten gefunden. Das aus dem Magen stammende Hormon Ghrelin ist ein vollständiger Agonist, Adenosin ein partieller Agonist [2].

Die GHS können die GH-Freisetzung über 4 verschiedene Mechanismen erhöhen:

- verstärkte GHRH-Sekretion (growth hormone releasing hormone) im Hypothalamus, dadurch erhöhte GH-Freisetzung aus der Hypophyse
- modifizierte GHRH-Signaltransduktion
- Verminderung der Somatostatinfreisetzung, welches einen hemmenden Einfluss auf die GH-Sekretion verübt
- Antagonisierung der inhibitorischen Wirkung von Somatostatin auf die GH-Freisetzung

Diese erhöhten GH-Konzentrationen wirken sich nachhaltig positiv auf den Organismus aus. Die möglichen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten der GHS werden in einem gesonderten Abschnitt zu einem späteren Zeitpunkt erörtert.

## **2.2 Ghrelin**

Ghrelin ist ein Polypeptid aus 28 Aminosäuren, das 1999 entdeckt wurde und auf Grund seines Einflusses auf die GH-Sekretion zur Gruppe der GHS gezählt wird.

Es wird hauptsächlich von den entero-endokrinen Zellen der Magenschleimhaut sezerniert, in geringer Menge kommt es auch in anderen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts sowie in der Hypophyse und im Hypothalamus vor. Seine Konzentration steigt im Nüchternzustand und vermindert sich nach Nahrungsaufnahme. Zu seinen hauptsächlichen Wirkungen werden die Stimulation und Modulation der GH-Freisetzung [3] sowie eine Steigerung des Appetits [4, 5] gezählt. Neben diesen verfügt das Ghrelin über eine Reihe weiterer Wirkungen auf den Metabolismus. So stimuliert es die ACTH- und Prolaktinfreisetzung und wahrscheinlich auch die Insulinsekretion [1]. Weiter erzielt Ghrelin eine Verbesserung der Hämodynamik [6, 7], Förderung der Knochenmineralisation und -dichte [2] sowie Steigerung der Magendarmmotilität [8].

## **2.3 Wachstumshormon**

Die zyklische Freisetzung von Hormonen in der Hypophyse wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse reguliert. Im Hypothalamus werden verschiedene Releasinghormone produziert, welche auf Rezeptoren in der Hypophyse wirken und die Sekretion ihrer entsprechenden Hormone provozieren. Durch das GH-Releasinghormon (GHRH) wird im Hypophysenvorderlappen die Ausschüttung von GH stimuliert. Dieses wiederum übt seine Wirkung auf seine Zielorgane direkt und indirekt aus.

Zu den direkten Wirkungen des GH werden die Aktivierung der Lipase im Fettgewebe, Induktion von Insulinresistenz sowie Wasser- und Natriumretention gezählt. Durch die Aktivierung der Fettgewebslipase steigt die Konzentration an freien Fettsäuren an. Über eine Hemmung der peripheren Glukoseaufnahme entsteht eine Insulinresistenz, deren Folgen eine Glukoseintoleranz mit konsekutiver Hyperinsulinämie ist. Die Wasser- und Natriumretention kommt durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems zustande.

Die indirekten Wirkungen des GH werden über das IGF-1 vermittelt, welches via Stimulation von GH in der Leber produziert und sezerniert wird. Zu den indirekten Wirkungen gehören zum

Beispiel die Stimulation der Synthese der Matrix im Knochen und Knorpelgewebe und die Steigerung der Proteinsynthese [9, 10].

Bei Personen, welche auf Grund ihrer klinischen Symptome eine Hypophysenvorderlappen-Unterfunktion vermuten lassen, kann mittels Funktionstest ein GH-Defizit nachgewiesen werden. Durch den GHRH-Stimulationstest wird geprüft, ob eine GH-Sekretion im Hypophysenvorderlappen provoziert wird nach intravenösen Gabe von GHRH. Auf diese Weise kann unterschieden werden, ob der GH-Mangel aufgrund einer mangelnden GHRH-Produktion im Hypothalamus besteht (Sekretionsstörung) oder ob die GH-Produktion im Hypophysenvorderlappen insuffizient ist.

Ein weiterer wirksamer Test zur Erfassung der GH-Sekretion ist der sogenannte Insulintoleranz-Test (ITT). Durch Gabe von Insulin sinkt der Blutzuckerspiegel, was bei Gesunden die GH-Sekretion stimuliert. Dieser Test erfasst zwar ein GH-Defizit zuverlässig, ist jedoch in vielen klinischen Situationen bei Personen mit einem GH-Mangel kontraindiziert, da eine Hypoglykämie wesentliche Gefahren birgt.

Der GHRH-Stimulationstest in Kombination mit einem GHS könnte somit einen effizienten, sicheren und verlässlichen Test zur Diagnose einer GH-Defizienz darstellen und auch in Situationen eingesetzt werden, in denen ein ITT kontraindiziert ist [11].

## **2.4 ARD-07:**

Die in dieser Studie verwendete Testsubstanz, ARD-07 (früher als Epo1572 bekannt) wurde als oral applizierbares GHS-Analog identifiziert. Grundlage dazu bildet das Hexapeptid Hexarelin, das als GHS Analog wirkt, die GH-Freisetzung stimuliert, aber eine schlechte orale Bioverfügbarkeit aufweist [12]. ARD-07 ist ein Ghrelin-Agonist mit potenter Wirkung auf die GH-Freisetzung mit einer Molekülgröße von 475 D. Die gute orale Bioverfügbarkeit von ARD-07 konnte kürzlich nachgewiesen werden (bei Applikation im Nüchternzustand) [3]. Im Gegensatz zum Ghrelin verändert ARD-07 die Prolaktin-, ACTH- und Kortisol-Konzentrationen nicht.

## **2.5 Anwendungsmöglichkeiten von ARD-07:**

Der potentielle Einsatz von ARD-07 ist vielschichtig. Einerseits könnte es auf Grund seiner GH-stimulierenden Wirkung als diagnostischer Test zur Detektion eines GH-Mangels, andererseits auch als Therapieoption bei einem GH-Defizit eingesetzt werden (bei erhaltener Funktion des Hypophysenvorderlappen), beispielsweise beim Prader-Willi und Turner-Syndrom. Weitere potentielle Anwendungsindikationen sind Situationen, in denen eine Steigerung des Appetits erwünscht ist, zum Beispiel bei kachektischen Zuständen, bei Patienten mit AIDS-wasting oder fortgeschrittenem Tumorleiden [4, 5]. Ein anderer Bereich stellt die postoperative Rehabilitation bei älteren Patienten nach Hüftfrakturen dar. Durch erhöhte GH-Konzentrationen wird die Knochenmineralisation und –Dichte gefördert und damit eine kürzere Rekonvaleszenzzeit sowie eine moderate Verbesserung der Muskelkraft erzielt [2].

Auch wird dem Ghrelin eine potente prokinetische Wirkung zugeschrieben mit Förderung der Magenentleerung, was beispielsweise bei Diabetikern mit einer Gastroparese oder zur Prävention eines postoperativen gastrointestinalen Ileus von Interesse ist [8]. Auch die Hämodynamik wird durch die hormonellen Effekte des Ghrelins positiv beeinflusst. Erste Resultate zeigen, dass durch dreiwöchige i.v. Infusionen von synthetischem Ghrelin die kardiovaskuläre Funktion signifikant verbessert wird mit Verminderung der Nachlast sowie einer Erhöhung des Herzzeitvolumens und der Herzfrequenz [6]. Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zeigte sich eine Verbesserung der linksventrikulären Dysfunktion sowie Verminderung der kardial bedingten Kachexie durch chronische subkutane Ghrelin-Administration [7].

Ob die Resorption von ARD-07 durch die gleichzeitige Nahrungseinnahme verändert wird, wurde bisher nicht untersucht. Diese Frage ist aber wichtig im Hinblick auf eine klinische Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Bedeutung der Nahrungseinnahme auf die Bioverfügbarkeit von ARD-07 untersucht.



### **3. Zielsetzung der Arbeit**

#### **3.1 Primäres Ziel**

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer Mahlzeit auf die orale Bioverfügbarkeit von ARD-07 zu quantifizieren. Es wurde nach signifikanten Veränderungen der Resorption im Zusammenhang mit einer gleichzeitig eingenommener Standardmahlzeit gesucht.

#### **3.2 Sekundäre Ziele**

Sekundäre Ziele dieser Arbeit waren:

- Sicherheit und Verträglichkeit von ARD-07 überprüfen
- Plasmakinetik von ARD-07 aufzeigen
- Pharmakodynamik von ARD-07 (GH-Freisetzung) messen

## **4. Methodik**

### **4.1 Versuchspersonen**

Für die Studie wurden 16 Probanden (8 männliche, 8 weibliche) mit einem Durchschnittsalter von  $23 \pm 2$  Jahren rekrutiert. Als Einschlusskriterien wurden definiert:

- Alter zwischen 18 und 45 Jahren
- Gewicht im Normalbereich ( $BMI > 18.5$  und  $< 25$ )
- Guter Gesundheitszustand (psychisch und physisch)
- Kein Arzneimittel-, Drogen- und Nikotinabusus
- Keine aktuellen medizinischen Probleme
- Keine Medikamenteneinnahme
- Keine Allergien (inkl. Lebensmittelallergien)
- Keine früheren, gastrointestinalen Beschwerden oder Gewichtsprobleme
- Negativer Schwangerschaftstest bei den weiblichen Probandinnen
- Schriftlicher informed consent

Nachdem die Versuchspersonen schriftlich über die Studie, deren mögliche Risiken sowie über die jederzeitige Ausstiegsmöglichkeit aufgeklärt wurden, gaben sie ihr schriftliches Einverständnis. Im Anschluss wurden im Rahmen der Voruntersuchung Grösse, Gewicht, BMI, Blutdruck, Puls, die persönlichen Daten und die Rasse notiert. Eine körperlicher Status, ein EKG sowie verschiedene Blutuntersuchungen vervollständigten die Eintrittsuntersuchung. Jeder der Probanden gab an, normale Essgewohnheiten einzuhalten. Das Protokoll der Studie wurde dem „Ethischen Komitee beider Basel“ vorgelegt und von diesem genehmigt.

## **4.2 Studiendesign**

Die Studie wurde als randomisierte Phase I, open-label, cross-over, Einzeldosis-Studie geplant und durchgeführt, wobei jeder Proband zwei Einzeldosen der Substanz erhielt, einmal mit und einmal ohne Standardmahlzeit.

## **4.3 Versuchsablauf**

Für die Studie waren pro Proband zwei Versuchstage vorgesehen: einmal erfolgte die Applikation der Testsubstanz mit und einmal ohne gleichzeitige Nahrung (Trinknahrung Resource 2.0 Fibre (Novartis), 200 ml, 400 kcal/Packung) in randomisierter Reihenfolge. Zwischen den einzelnen Versuchstagen lagen jeweils mindestens sieben versuchsfreie Tage.

Die Versuchspersonen durften am Vorabend ab 22 Uhr nichts mehr essen und ausser Wasser auch nichts trinken. Pro Studientag fanden sich 4 Versuchsteilnehmer um 07:30 nüchtern in der Forschungsstation des Universitätsspitals Basel ein. Nach Abgabe eines Nüchtern-Urin, Temperatur- und Blutdruckmessung sowie Befragung zu unerwünschten Ereignissen seit der Voruntersuchung bzw. vorangegangenen Studientag haben wir allen Probanden einen Venenkatheter gelegt und den Blutdruck monitorisiert.

Vor der Einnahme der Testmedikation (ARD-07) erfolgten bei allen Probanden zwei Blutentnahmen (-15', -5'). Weitere Blutproben haben wir bis 24 Stunden nach Einnahme der Testmedikation zu den Zeitpunkten 15', 30', 45', 60', 75', 90', 120', 180', 240', 360', 480', 720' und 1440' (24h) entnommen; zeitgleich zu den Blutentnahmen wurde der Blutdruck gemessen.

In den ersten 4 Stunden nach Einnahme der Testmedikation mussten die Probanden in liegender Position verweilen und durften keinerlei Nahrung oder Getränke zu sich nehmen. Nach 4 Stunden erhielten sie ein standardisiertes Mittagessen (Omelette mit Gemüse und Salat) serviert. Ab diesem Zeitpunkt durften die Versuchspersonen auch nach Belieben nicht-kohlensäurehaltiges Wasser trinken. 6 Stunden nach Verabreichung der Testmedikation durften die

Versuchsteilnehmer die Forschungsstation verlassen und mussten sich jeweils 15 Minuten vor der nächsten Blutentnahme wieder in der klinischen Forschungsstation einfinden.

Die Blutproben wurden zentrifugiert und in Plasmaröhrchen eingefüllt, und blieben bei  $-20^{\circ}$  in der Klinischen Forschungsstation gelagert bis zur Entsendung zur analytischen Untersuchung.

Nach Abschluss der beiden Versuchstage haben wir alle Probanden innerhalb einer Woche für eine Schlussuntersuchung aufgeboten. In diesem Rahmen erfolgte nochmals eine Befragung zum Gesundheitszustand und zum Auftreten von allfälligen unerwünschten Ereignissen. Ebenfalls wurden die Vitalzeichen festgehalten und eine eingehende Blutuntersuchung, ein Urinstatus sowie ein EKG durchgeführt.

## **4.4 Material**

### **4.4.1 ARD-07 Applikation**

Die Testmedikation ARD-07 wurde von Ardana Bioscience Ltd., Edinburgh, U.K. zur Verfügung gestellt. Die Probanden erhielten eine Dosis von 0.5mg/kg ARD-07 in sterilem Wasser aufgelöst per os. Das Gesamtvolumen, das jede Versuchspersonen einnahm, entsprach 1 ml Lösung pro Kilogramm Körpergewicht.

Bei jeder Blutprobenentnahme haben wir die ersten 2 ml Blut verworfen. Die Proben wurden in 9 ml Monovetten eingefüllt, welche anschliessend zentrifugiert und auf 4 Plasmaröhrchen verteilt wurden. Nach den Blutentnahmen wurde der Venenkatheter mit 5 ml NaCl gespült. Insgesamt haben sich pro Proband 15 Blutentnahmen je Versuchstag ergeben.

#### **4.4.2 Blutentnahmen und Behandlung der Blutproben**

Venenkatheter:

- Venenverweilkatheter Optiva ® 2,18G, Medex
- Mehrweghahn Discofix C-3 blau, B.Braun

Zur Verwerfung:

- 2 ml Spritzen LUER ONCE

#### **4.5 Bestimmungen**

Aus den Blutproben wurden zu den Zeitpunkten –15', –5', 15', 30', 45', 60', 75', 90', 120', 180', 240', 360', 480', 720' und 1440' die Plasmakonzentrationen von ARD-07 und GH bestimmt.

Die Plasma-Glukose wurde zu den Zeitpunkten –15', 30', 45', 60', 90', 120', 180', 240' und 360' bestimmt. Zu den Zeitpunkten –15', 720' und 1440' wurden zusätzlich die IGF-1-Plasmakonzentrationen bestimmt.

##### **4.5.1 ARD-07-Bestimmung**

Die Analyse der Plasmaproben zur Bestimmung der ARD-07-Konzentrationen erfolgte durch eine validierte LC-MS/MS Methode. Die Messungen wurden bei Prolytic GmbH, Alt Fechenheim 34, D-60386 Frankfurt in Deutschland durchgeführt [3].

##### **4.5.2 GH-Bestimmung**

Die GH-Plasmakonzentrationen wurden im Labor von Dr. Hans Ørskov, Institute of Experimental Clinical Research, Medical Research Laboratories, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark, mit Hilfe eines spezifischen Assays für humanes GH (fluoroimmunoassay (FIA) AutoDELPHIA<sup>®</sup> hGH) [13] bestimmt.

#### **4.5.3 IGF-1-Bestimmung**

Die IGF-1-Plasmakonzentrationen wurden durch einen „time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA)“ bestimmt [14].

#### **4.5.4 Glukose-Bestimmung**

Die Plasma-Glukosebestimmungen wurde im Labor des Universitätsspitals Basel vorgenommen (Hexokinase Aktivitätsmessung, plasmareferenzierte Werte, ASCENSIA Testkit).

## **5. Statistik**

### **5.1 Pharmakokinetik**

Folgende pharmakokinetische Parameter wurden berechnet: die maximale Plasmakonzentration ( $C_{\max}$  [ng/ml]), die Fläche unter der Kurve ( $AUC_{(0-24h)}$  [ngxh/ml]) sowie das Zeitintervall bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration ( $T_{\max}$  [h]). Die Halbwertszeit ( $T_{1/2}$  [h]) wurde geschätzt durch ein „non-compartmental“ Verfahren durch Verwendung der WinNonlin Software (Version 5.01; Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

### **5.2 Statistische Analysen**

Die Darstellung der demographischen Parameter erfolgte deskriptiv (Alter, Gewicht, Grösse, BMI). Alle 16 Probanden konnten für die pharmakokinetische Analyse eingesetzt werden. Die Fläche unter der Kurve (AUC),  $T_{\max}$  und  $C_{\max}$  wurden durch lineare Regression bestimmt. Die verschiedenen pharmakokinetischen Parameter wurden mittels Varianz-Analyse (ANOVA) untereinander verglichen. Falls dabei statistisch signifikante Unterschiede errechnet wurden, wurde nach der ANOVA ein Dunnett Test (Dunnett's multicomparison) durchgeführt. Alle statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe von SPSS für Windows Applikationen (Version 14.0). Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant gewertet, wenn der p-Wert  $< 0.05$  betrug. Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of the mean) dargestellt, wenn nicht anderweitig erwähnt.

## 6. Resultate

### 6.1 ARD-07-Plasmakonzentrationen

Der zeitliche Verlauf der Plasmakonzentrationen von ARD-07 nach oraler Verabreichung mit und ohne gleichzeitige Nahrungsaufnahme ist in der folgenden Grafik dargestellt.

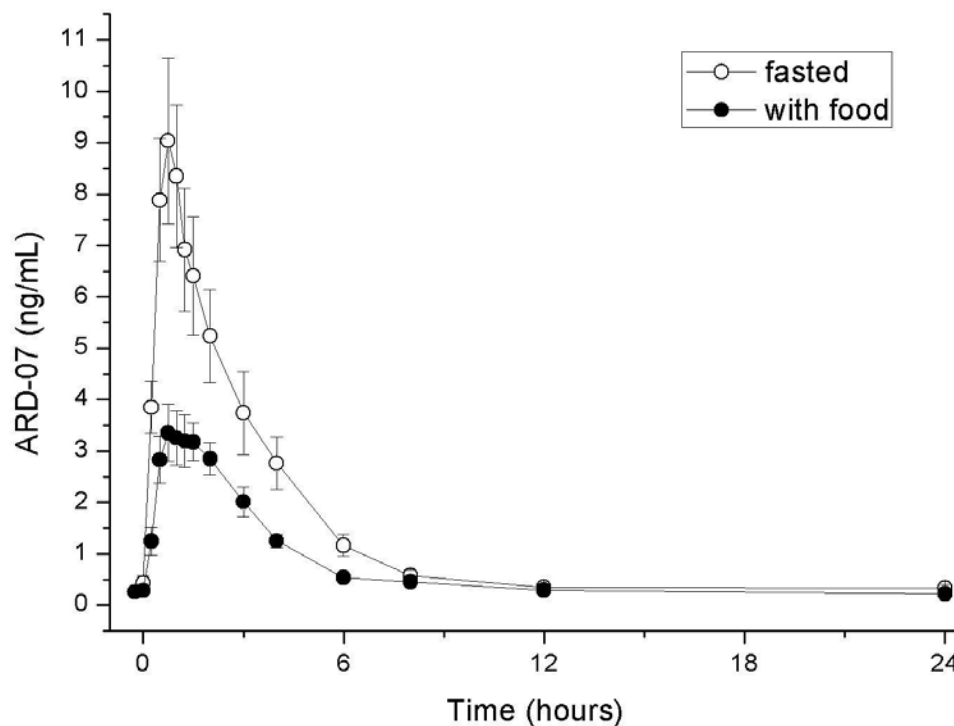


Abb. 1: Plasmakonzentrationen von ARD-07 nach Applikation der Testsubstanz (0.5mg/kg Körpergewicht) mit und ohne Nahrung bei 16 Versuchspersonen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM.

Aus der Grafik ist erkennbar, dass eine rasche Resorption der Testsubstanz stattfindet. Die Fläche unter der Kurve definiert als AUC (area under the plasma ARD-07 concentration vs. time curve) vom Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt 24 Stunden ( $AUC_{(0-24)}$ ) ist etwa doppelt so hoch, wenn die Testsubstanz ohne Nahrung verabreicht wird ( $27.8 \pm 4.1$  ng/ml) im Vergleich zur Verabreichung mit Nahrung ( $13.7 \pm 1.2$  ng/ml,  $p=0.002$ ), siehe Tabelle 1 auf Seite 32.



Die maximal erreichten Konzentrationen von ARD-07 betragen mehr als das Doppelte ohne Nahrung ( $C_{\max}$   $10.6 \pm 1.6$  ng/ml) im Vergleich zur maximalen Konzentration mit Nahrungseinnahme ( $4.4 \pm 0.5$  ng/ml,  $p=0.001$ ).

Auch bezüglich der Resorptionsgeschwindigkeit finden sich Unterschiede; so wird die maximale Konzentration der Testsubstanz bei Zufuhr im Nüchternzustand schneller erreicht ( $T_{\max}$ :  $0.8 \pm 0.1$  h) im Vergleich zum Versuch mit Nahrungszufuhr ( $1.1 \pm 0.2$  h,  $p=0.073$ ), dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ) von ARD-07 ist bei beiden Applikationsarten vergleichbar. Ohne Nahrung beträgt diese  $3.8 \pm 0.5$  h, mit Nahrung  $3.9 \pm 0.5$  h.

Da die 90% Konfidenz-Intervalle (CI) der geometrischen Mittelwert-Ratios (mit Nahrung/ohne Nahrung) für  $AUC_{(0-t)}$  (90% CI: 0.436-0.596) und  $C_{\max}$  (90% CI: 0.386-0.533) alle ausserhalb des vor der Studie festgelegten Äquivalenzbereiches von 80-125% liegen gilt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Applikationsformen als nachgewiesen (für ausführlichere Informationen siehe Tabellen 1 und 2 auf Seite 32).

## 6.2 GH-Plasmakonzentrationen:

In der folgenden Grafik ist der zeitliche Verlauf der GH-Plasmakonzentrationen dargestellt.

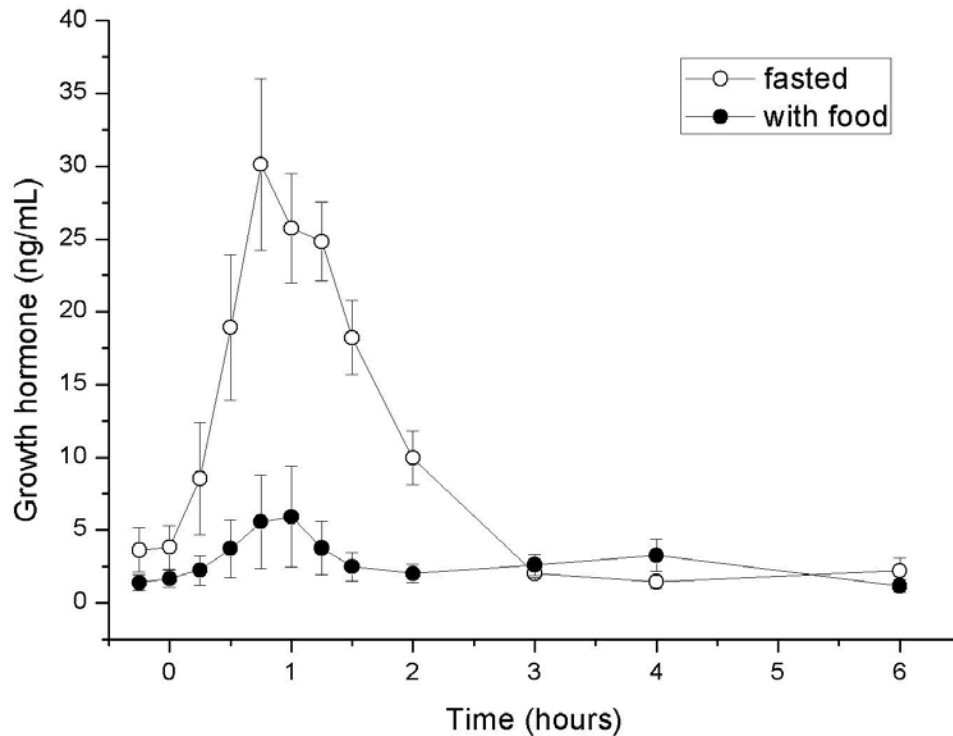


Abb. 2: GH-Plasmakonzentrationen, Effekt von ARD-07 mit/ohne Nahrungszufuhr auf die GH-Sekretion. Die Daten entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM.

Die Nüchternwerte für GH, welche alle im Normbereich liegen, sind in beiden Studienteilen vergleichbar:  $2.4 \pm 0.2$  ng/ml mit Nahrung und  $2.6 \pm 0.9$  ng/ml ohne Nahrung. Die AUC vom Zeitpunkt 0-6 ( $AUC_{(0-6)}$ ) beträgt mehr als das Doppelte bei der Applikationsform ohne Nahrung ( $47.5 \pm 5.7$  ng/ml mit Nahrung,  $17.5 \pm 4.7$  ng/ml ohne Nahrung,  $p < 0.001$ , siehe Tabelle 3 auf Seite 33). Bei der Applikationsform ohne Nahrung ist ein markanter Anstieg der GH-Konzentration nach etwa 60 min. ab Einnahme der Testsubstanz zu verzeichnen, was zeitlich mit deren maximalen Plasmakonzentration übereinstimmt ( $C_{max}$   $37.1 \pm 5.3$  ng/ml). Die höchsten GH-Konzentrationen bei Applikation mit Nahrung sind signifikant kleiner ( $13.0 \pm 3.5$  ng/ml,  $p = 0.001$ ) und erfolgen zu einem signifikant späteren Zeitpunkt (nach 210 min.,  $p = 0.001$ ).

### 6.3 Plasma-Glukosekonzentrationen:

Die Nüchternglukosewerte, welche alle im Normbereich liegen, sind in beiden Studienteilen vergleichbar. Ein signifikanter ( $p < 0.001$ ) Anstieg der Plasma-Glukosekonzentration ist im Versuchsteil mit Nahrungseinnahme zu erkennen (siehe Tabelle 3 auf Seite 33). Die gleichzeitige Nahrungsaufnahme mit entsprechendem Anstieg der Plasma-Glukose könnte neben den verminderten ARD-07-Konzentrationen eine Erklärung für die verminderte GH-Sekretion sein, da bekannt ist, dass Erhöhungen der Plasma-Glukosekonzentration die GH-Sekretion hemmen [15].

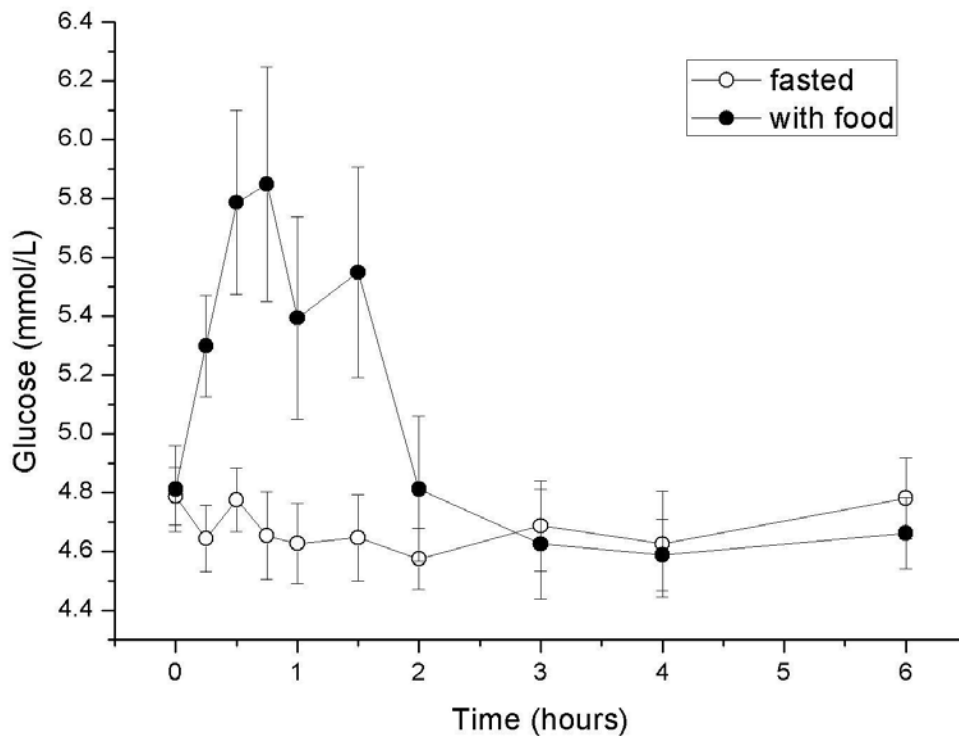


Abb.3: Plasma-Glukosekonzentrationen. Effekt des ARD-07 mit/ohne Nahrungszufuhr auf die Plasma-Glukosekonzentrationen. Die Daten entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM.

#### **6.4 IGF-1-Plasmakonzentrationen:**

Die IGF-1 Spiegel im Nüchternzustand betrugen  $222 \pm 11$  ng/ml im Versuchsteil mit Nahrung und  $233 \pm 13$  ng/ml ohne Nahrungseinnahme. Die höchsten IGF-1-Plasmakonzentrationen wurden nach 24 h gemessen:  $257 \pm 15$  ng/ml ohne Nahrungszufuhr und  $236 \pm 13$  ng/ml mit Nahrungszufuhr, der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Alle gemessenen Werte liegen im Normbereich.

#### **6.5 Unerwünschte Nebenwirkungen von ARD-07:**

Die Testsubstanz wurde von allen Versuchspersonen gut toleriert und es traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf. Bei sieben der sechzehn Versuchspersonen im Versuchsteil mit Nahrungszufuhr und bei acht Versuchspersonen im Versuchsteil ohne Nahrungszufuhr traten unerwünschte Nebenwirkungen auf. Am häufigsten wurde über Kopfschmerzen berichtet (5 Versuchspersonen im Studienteil mit Nahrungszufuhr und 4 Personen im Studienteil ohne Nahrungszufuhr). Als zweithäufigste Nebenwirkung traten Rhinopharyngitiden auf (3 Versuchspersonen im Studienteil mit Nahrungszufuhr und eine Versuchsperson im Studienteil ohne Nahrungszufuhr). Alle Nebenwirkungen wurden als mild bis moderat gewertet.

Lediglich bei einer Person im Versuchsteil mit Nahrung (Kopfschmerzen) und bei 2 Personen im Versuchsteil ohne Nahrung (Durchfall, Kopfschmerzen) wurden diese Nebenwirkungen als Folge der Testsubstanz bewertet.

## 7. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer gleichzeitigen Nahrungszufuhr bei einer einmaligen Verabreichung einer oralen Dosis ARD-07, einem synthetischen Ghrelinagonisten, auf dessen Pharmakokinetik untersucht sowie seine Effekte auf die GH- und IGF-1-Sekretion.

Die Testsubstanz wird rasch nach Einnahme durch den Magendarmtrakt resorbiert und erreicht die höchsten Plasmakonzentrationen nach etwa einer Stunde. Bei gleichzeitiger Nahrungszufuhr ist die Resorption von ARD-07 um mehr als die Hälfte vermindert.

Da die 90% Konfidenz-Intervalle (CI) der geometrischen Mittelwert-Ratios (mit Nahrung/ohne Nahrung) für AUC und  $C_{\max}$  alle ausserhalb des vor der Studie festgelegten Äquivalenzbereiches von 80-125% liegen, kann abgeleitet werden, dass eine gleichzeitige Nahrungsaufnahme die Resorption von ARD-07 signifikant beeinflusst.

Wie eingangs beschrieben, stimuliert ARD-07 die Sekretion von GH. Die höchsten GH-Plasmakonzentrationen wurden bei Einnahme ohne Nahrungszufuhr früher erreicht als bei gleichzeitiger Nahrungsaufnahme und waren bis 3 Stunden nach Einnahme der Testsubstanz nachzuweisen, was mit dem Verlauf der ARD-07-Plasmakonzentrationen korreliert. Bei gleichzeitiger Nahrungszufuhr persistieren die erhöhten GH-Plasmakonzentrationen wesentlich kürzere Zeit und darüber hinaus unproportional im Vergleich zu den gleichzeitig gemessenen ARD-07-Plasmakonzentrationen. Dieser Effekt kann dem Anstieg der Plasma-Glukose nach Nahrungseinnahme mit konsekutiver Hemmung der GH-Sekretion zugeschrieben werden [15].

Die höchsten IGF-1-Plasmakonzentrationen wurden nach 24 Stunden (dem letzten Messzeitpunkt) gemessen und waren im Studienteil mit Nahrungszufuhr etwas höher, jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant.

Makromoleküle ( $> 700$  Dalton), vor allem Peptide, zeichnen sich aufgrund ihrer molekularen Grösse und physikalischen und chemischen Eigenschaften durch eine schlechte orale Bioverfügbarkeit aus [16-19]. Im Gastrointestinaltrakt werden Peptide nach kurzer Zeit durch Verdauungsenzyme zersetzt und zu Aminosäuren abgebaut [20]. Die proteolytische Enzymaktivität ist im Magen und Duodenum am höchsten und vermindert sich im distalen Dünndarm stark. Es wurde nach Möglichkeiten gesucht, eine spezifische Resorption im distalen Dünndarm/Dickdarm zu erzielen um der Zersetzung durch die proteolytischen Enzyme im oberen Gastrointestinaltrakt zu entgehen. [21-24]. Das grösste Problem bei diesem Ansatz stellen jedoch die verspätete Resorption und die geringen Kontrollmöglichkeiten der Resorptionszeit dar. Diese variiert stark aufgrund der grossen individuellen Unterschiede bezüglich der Darmmotilität und Magenentleerung. Wie auch in dieser Studie festgestellt, interferiert zudem gleichzeitig eingenommene Nahrung mit der Peptidresorption. So müssen andere Wege gefunden werden, um das Problem der unterschiedlichen Resorption zu umgehen.

In neuen Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass mittels bestimmter Massnahmen, wie zum Beispiel Verwendung von Carrier-Molekülen, die Peptide vor einer Degradation geschützt werden [25-28]. Als Beispiel für ein solches Carrier-Molekül ist SNAC (Sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino] zu nennen, welches eine nicht-kovalente, reversible Bindung mit Peptiden eingeht. Dieses kleine organische Molekül ist eine hydrophobe Substanz, welche die Lipophilie von Peptiden durch reversible Veränderung der Tertiärstruktur (wodurch lipophile Reste an die Peptidoberfläche gelangen) erhöht, so dass die Resorption oral applizierter Peptide erleichtert wird [27]. Die Bindung ist reversibel und löst sich nach Übertritt in die Blutbahn auf. Die Verwendung von Carrier-Molekülen stellt somit einen interessanten Ansatz zur Überwindung der oben genannten Probleme der Peptidresorption dar und könnte auch für die Verbesserung der Bioverfügbarkeit von ARD-07 erwogen werden.

ARD-07 wurde von allen Versuchsteilnehmern gut toleriert. Es traten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf.

Zusammenfassend liessen sich in der vorliegenden Studie signifikante Unterschiede in der Menge an resorbiertem ARD-07 und den maximal erreichten Plasmakonzentrationen bei Einnahme von ARD-07 mit oder ohne gleichzeitiger Nahrungszufuhr nachweisen. Die Sekretion von GH wird durch die Testsubstanz stimuliert und widerspiegelt die jeweiligen ARD-07-Plasmakonzentrationen.

### **Schlussfolgerung:**

ARD-07 könnte als synthetischer Ghrelinagonist in verschiedenen medizinisch relevanten Bereichen pharmakologische Anwendung finden [3]. Aufgrund seiner GH-stimulierenden Wirkung könnte ARD-07 beispielsweise als diagnostischer Test oder als Therapieoption bei GH-Defizienz eingesetzt werden. Weitere Indikationen stellen Situationen dar, in denen eine Steigerung des Appetits erwünscht ist, wie kachektische Zustände, AIDS-Wasting, kardiale Kachexie und fortgeschrittene Tumorleiden. Andere potentielle Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich in der postoperative Rekonvaleszenz nach Hüftfrakturen bei geriatrischen Patienten [2], bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz [6, 7] sowie bei Patienten mit einer Gastroparese oder zur Prävention eines postoperativen gastrointestinalen Ileus [8].

Aufgrund seiner ungenügenden Bioverfügbarkeit bei oraler Aufnahme mit gleichzeitiger Nahrungsaufnahme muss jedoch eine alternative Applikationsform gefunden werden, da eine intravenöse oder subkutane Verabreichung für länger andauernde Behandlungen aufwändig und ungeeignet ist. Eine mögliche Option wäre die Verwendung von Carrier-Molekülen zur Verbesserung der Resorption und gezielteren Aufnahme des Peptids.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Broglio F, Arvat E, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, et al. Natural and synthetic growth hormone secretagogues: do they have therapeutic potential? *Treat Endocrinol* 2003; 2(3): 153-63.
- [2] Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, Papotti M, Cuccioli G. Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62 (1): 1-17.
- [3] Piccoli F, Degen L, MacLean C, Peter S, Baselgia L, Larsen F, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of an oral ghrelin agonist in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(5): 1814-20.
- [4] Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992.
- [5] Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC, Bloom SR. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2832-6.
- [6] Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: 1483-7.
- [7] Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001; 104: 1430-5.



- [8] Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, St-Pierre S, Bannon P, L'Heureux MC, Poitras P. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G948-52.
- [9] Spinas G, Fischli S. Hypothalamus und Hypophyse. In: *Endokrinologie und Stoffwechsel*. Thieme Verlag Stuttgart, New York 2001; 13-36.
- [10] Projekt MEGRU – medizinische Grundlagen, diverse Autoren, Universität Zürich <http://www.megru.unizh.ch>.
- [11] Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, et al. Novel analogs of ghrelin: physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 2004; 151 Suppl 1: 71-5.
- [12] Nogueiras R, Perez-Tilve D, Wortley KE, Tschop M. Growth hormone secretagogue (ghrelin-) receptors – a complex drug target for the regulation of body weight. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006; 5(3): 335-343.
- [13] Ørskov H, Frystyk J, Nielsen C, Hansen AT, Weeke J, Jørgensen JO. Concomitant, specific determination of growth hormone and pegvisomant in human serum. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17(5): 431-4.
- [14] Frystyk J, Dinesen B and Orskov H. Non-competitive Time-resolved Immunofluorometric Assays for Determination of Human Insulin-like Growth Factor I and II. *Growth Regulation* 1995; 5: 169-176.
- [15] Cryer PE. Glucose homeostasis and hypoglycemia. In: *Williams Textbook of Endocrinology*. Wilson JD and Foster DW (Eds). WB Saunders Company, Philadelphia 1992; 1223-1228.
- [16] Bernkop-Schnurch A, Walker G. Multifunctional matrices for oral peptide delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001; 18: 459-501.
- [17] Gomez-Orellana I. Strategies to improve oral drug bioavailability. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2: 419-33.

- [18] Donovan MD, Flynn GL, Amidon GL. Absorption of polyethylene glycols 600 through 2000: the molecular weight dependence of gastrointestinal and nasal absorption. *Pharm Res* 1990; 7: 863-8.
- [19] Donovan MD, Flynn GL, Amidon GL. The molecular weight dependence of nasal absorption: the effect of absorption enhancers. *Pharm Res* 1990; 7: 808-15.
- [20] Woodley JF. Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1994; 11: 61-95.
- [21] Fix JA. Strategies for delivery of peptides utilizing absorption-enhancing agents. *J Pharm Sci* 1996; 85: 1282-5.
- [22] Goldberg M, Gomez-Orellana I. Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 289-95.
- [23] Buclin T, Cosma Rochat M, Burckhardt P, Azria M, Attinger M. Bioavailability and biological efficacy of a new oral formulation of salmon calcitonin in healthy volunteers. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1478-85.
- [24] Tozaki H, Emi Y, Horisaka E, Fujita T, Yamamoto A, Muranishi S. Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat caecal contents: implications in peptide delivery to the colon. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 164-8.
- [25] Tozaki H, Komoike J, Tada C, Maruyama T, Terabe A, Suzuki T, et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1016-21.
- [26] Arbit E, Goldberg M, Gomez-Orellana I, Majuru S. Oral heparin: status review. *Thromb J* 2006; 4: 6.
- [27] Mousa S, Zhang F, Aljada A, Chaturvedi S, Takieddin M, Zhang H, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral heparin solid dosage form in healthy human subjects. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 1508-1520.

[28] Beglinger C, Poller B, Arber E, Ganzoni C, Gass S, Gomez-Orellana I, Drewe J. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of oral GLP-1 and PYY3-36: a proof of concept study in healthy subjects. Clin Pharmacol and Therap 2008; in press.

## **9. Anhang**

### **9.1 Probandeninformation und Einwilligung**

Sehr geehrter Proband

Bitte lesen Sie die nachfolgende schriftliche Zustimmung sorgfältig durch und fragen Sie uns bei Unklarheiten.

#### **Schriftliche Zustimmung zur Teilnahme am Versuch: Bioavailability of EP01572 (ARD-07) with and without food**

**Sponsor:** ardana Bioscience Ltd, Edinburgh, UK

#### **Beschreibung/Zweck des Versuches**

Es handelt sich hierbei um eine medizinische Forschungsstudie an zwei Versuchstagen. Ihr Zweck besteht darin zu untersuchen, wie viel von der Testsubstanz EPO1572 (Code Name: ARD07), ein synthetisches Analog des natürlichen Hormons Ghrelin, beim Menschen nach oraler Einnahme aufgenommen wird. EPO1572 (ARD07) ist ein synthetisches Analog eines körpereigenen Hormons, welches verschiedene hormonelle Wirkungen ausübt (Stimulation von Wachstumshormon, Insulin, Cortisol).

In dieser Versuchsreihe wird geprüft, inwieweit Nahrung die vom Körper aufgenommene Menge von oral verabreichtem EPO1572 beeinflussen kann. Die gesamte Studie wird an 2 Versuchstagen durchgeführt, die mindestens durch eine Woche getrennt werden müssen. An der Studie nehmen 8 männliche und 8 weibliche, gesunde Probanden teil. Vor Einschluss in die Studie erfolgt eine Voruntersuchung. Diese beinhaltet eine Untersuchung, ein Elektrokardiogramm sowie Laboruntersuchungen. Dabei wird Ihr Blut auf Viren untersucht (Hepatitis, HIV). Das Resultat dieser Untersuchung wird Ihnen mitgeteilt. Ein Versuchsteilnehmer erhält nur zwei Dosierungen von EPO1572. Die Studie umfasst demzufolge die nachfolgenden Versuche:

- 1) Orale Verabreichung von EPO1572 mit Nahrung.
- 2) Orale Verabreichung von EPO1572 ohne Nahrung.

#### **Versuchsablauf**

Am Morgen des Versuchstages müssen Sie nüchtern in die klinische Forschungsstation kommen. Anschliessend wird Ihnen an einem Arm ein Venenkatheter angelegt zu Blutentnahmen. Nach Entnahme einer Nüchternprobe wird Ihnen an einem Tag EPO1572 oral mit einer Testmahlzeit verabreicht, am andern Tag EPO1572 oral ohne Mahlzeit gegeben. Nach jeder Applikation erfolgen regelmässige Blutentnahmen über 24 Stunden hinweg.

### **Nutzen/Risiken**

Sie haben persönlich keinen direkten Nutzen vom Versuch; Sie können aber beitragen zur Entwicklung der Substanz für neue Therapien. Risiken im Zusammenhang mit der Versuchsreihe sind nicht bekannt. EPO1572 wurde bisher intravenös und oral an 44 Versuchspersonen verabreicht. Nebenwirkungen sind bisher keine aufgetreten. Falls neue Erkenntnisse auftreten, werden Ihnen diese sofort mitgeteilt.

### **Vertraulichkeit und Einsicht der persönlichen Akte**

Ihre Teilnahme am Versuch wird vertraulich behandelt und Sie haben jederzeit das Recht ihre Akte einzusehen. Die Daten werden anonymisiert. Sie sind nur Fachleuten zur wissenschaftlichen Auswertung zugänglich. Zu Kontrollen sind auch die Behörden berechtigt. Sie können im Rahmen von Inspektionen Einsicht in Ihre Originaldaten (Krankengeschichte, Labordaten, etc.) nehmen. Ebenso können die Ethikkommissionen Kenntnis von Originaldaten bekommen. Während der ganzen Studie und bei den erwähnten Kontrollen wird die Vertraulichkeit strikt gewahrt.

### **Informations- und Rücktrittsrecht**

Sie haben jeder Zeit das Recht sich nach potentiellen bzw. bekannten Risiken des Versuches zu erkunden. Ihre Teilnahme an diesem Versuch ist freiwillig. Sie sind jederzeit zum Rücktritt von der Versuchsreihe berechtigt. Die Studienleiter können ebenfalls im Interesse Ihrer eigenen Gesundheit bei unerwünschten Wirkungen und bei Nichtbefolgen der Studienordnung entscheiden, dass Sie die Studie abbrechen sollten. Bei frühzeitigem Studienabbruch werden Sie zu Ihrer Sicherheit abschliessend medizinisch untersucht. Die Resultate werden eventuell in einem medizinischen Journal publiziert, jedoch ohne Ihre Identität bekannt zu geben.

### **Bereitstellung von medizinischer/finanzieller Entschädigung**

Das Universitätsspital Basel ersetzt Ihnen Schäden, die Sie gegebenenfalls im Rahmen des klinischen Versuches erleiden. Zu diesem Zweck hat das Universitätsspital Basel zu Ihren Gunsten eine Versicherung bei der Zürich-Versicherung abgeschlossen. Stellen Sie während oder nach dem klinischen Versuch gesundheitliche Probleme oder Schäden fest, so wenden Sie sich an den verantwortlichen Arzt (Prof. C. Beglinger). Er weiss über die geltende Gesetzgebung Bescheid, verfügt über die entsprechenden Unterlagen und wird für Sie die notwendigen Schritte einleiten.

**Kontaktpersonen:** Prof. C.Beglinger (061-265 5175) oder klinische Forschungsstation (Frau Baselgia; Tel. 061-265 5650).

### **Entschädigung**

Für Ihre Mithilfe am Versuch werden Sie mit 800.00 CHF entschädigt.

## **EINWILLGUNG: Bioavailability of EP01572 (ARD-07)**

Ich hatte die Gelegenheit die Probandeninformation zu lesen und bin nach Aufklärung in der Lage, Wesen, Bedeutung und Tragweite der bevorstehenden Untersuchung zu verstehen. Ich bestätige, dass ich aufgrund der erhaltenen Informationen freiwillig an der Untersuchung teilnehme.

Die folgenden Punkte sind wichtig für die Studie:

- Der Einfluss von Nahrung auf die Aufnahme von oral verabreichtem EP01572 wird geprüft
- Die Studie umfasst die nachfolgenden zwei Versuche (orale Verabreichung von EP01572 mit und ohne Nahrung)
- Ich bin darüber informiert, dass ich im Falle von Schäden im Rahmen der Studie vom Universitätsspital Basel entschädigt werde. Zu diesem Zweck hat das Universitätsspital zu Ihren Gunsten eine Versicherung bei der Zürichversicherung abgeschlossen. Stellen Sie während oder nach dem klinischen Versuch gesundheitliche Probleme oder Schäden fest, so wenden Sie sich bitte an den verantwortlichen Arzt. Er weiss über die geltende Gesetzgebung Bescheid, verfügt über die entsprechenden Unterlagen und wird für Sie die nötigen Schritte einleiten.
- Ich bin einverstanden, dass die zuständigen Fachleute der Behörden und der Ethikkommissionen zu Prüf- und Kontrollzwecken in meine Originaldaten Einsicht nehmen dürfen, jedoch unter strikter Einhaltung der Vertraulichkeit.
- Ich nehme an dieser Studie freiwillig teil. Ich kann jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Zustimmung zur Teilnahme widerrufen, ohne dass mir deswegen Nachteile bei der weiteren medizinischen Betreuung entstehen. In diesem Fall werde ich zu meiner Sicherheit abschliessend medizinisch untersucht.
- Im Interesse meiner Gesundheit kann mich der Prüfarzt jederzeit von der Studie ausschliessen. Zudem orientiere ich den Prüfarzt über die gleichzeitige Behandlung bei einem anderen Arzt sowie über die Einnahme von Medikamenten (vom Arzt verordnete oder selbständig gekaufte).

Ort/Datum: .....Name Proband:.....

Unterschrift Proband:.....

Unterschrift Arzt: .....  
(oder Studien-Verantwortlicher)

## 9.2 Screeningformular

### SCREENING ARD-07

with/without food

Screening: Datum: \_\_\_\_\_ Subj. Nr.: \_\_\_\_\_ Init.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Probandeninformation / IC: Datum: \_\_\_\_\_ **Ausweis:** \_\_\_\_\_

Tel.Nr.:G: \_\_\_\_\_ P: \_\_\_\_\_ E-Mail: \_\_\_\_\_

Rasse: \_\_\_\_\_

Rauchen: \_\_\_\_\_ Alkohol: \_\_\_\_\_

Medikamente (letzte 2 Monate): \_\_\_\_\_ OTC-Medikamente: \_\_\_\_\_

Blutspende oder grössere Blutentnahme (letzte 3 Monate): \_\_\_\_\_

Allergien (speziell Medikamente): \_\_\_\_\_

Letzte Studienteilnahme: \_\_\_\_\_ Studienmedikation: \_\_\_\_\_

Grösse: \_\_\_\_\_ Gewicht: \_\_\_\_\_ BMI (18.5 - 25): \_\_\_\_\_

#### **Vital Signs / Labor:**

BD (liegend): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Puls (liegend): \_\_\_\_\_ (nach 5 Min.Liegen)

Temperatur: \_\_\_\_\_

EKG : Zeitpunkt: \_\_\_\_\_

Labor: Blutentnahme: Zeitpunkt: \_\_\_\_\_

Safety: Blutbild (2.6ml EDTA), Chemogr (5.5ml Hep.), Serologie (7.5 ml Z-Gel),  
Gerinnung (4.3ml 9NC),

Urin Combur 10: Datum: \_\_\_\_\_ Befund: \_\_\_\_\_

Dichte: \_\_\_\_ pH: \_\_\_\_ Sedi: (falls pos.-> Labor) \_\_\_\_\_

**Untersucherin:** \_\_\_\_\_

**Datum / Co-Investigator:** \_\_\_\_\_ **Incl.** **Excl.**

### 9.3 Tabellen 1-3: Resultate Statistik

**Table 1:** Effect of food on PK parameters based on ARD-07 concentrations in 16 healthy subjects (Data are mean±SEM with median in brackets)

	<b>Fasting</b>	<b>Fed</b>	<b>P-value</b>
<b>ARD-07</b>			
<b>AUC(0-24h)</b> (ng×h/ml)	27.84 ± 4.06 (20.58)	13.68 ± 1.24 (12.37)	0.002
<b>T<sub>1/2</sub></b> (h)	3.80 ± 0.53 (3.10)	3.87 ± 0.51 (3.54)	NS
<b>C<sub>max</sub></b> (ng/ml)	10.58 ± 1.56 (7.59)	4.41 ± 0.48 (3.89)	0.001
<b>T<sub>max</sub></b> (h)	0.78 ± 0.10 (0.75)	1.13 ± 0.15 (0.88)	0.073

**Table 2.** Effect of food on PK parameters in 16 healthy subjects: Ratios of PK endpoints

<b>Outcome</b>	<b>N</b>	<b>Ratio (With food/ Without food)</b>					
		<b>Min</b>	<b>Median</b>	<b>Max</b>	<b>Mean</b>	<b>Geometric mean</b>	<b>90% CI*</b>
AUC <sub>(0-t)</sub>	16	0.288	0.475	0.970	0.542	0.510	0.436 0.596
AUC <sub>(0-inf)</sub>	16	0.321	0.496	0.992	0.556	0.526	0.454 0.610
C <sub>max</sub>	16	0.216	0.461	1.163	0.486	0.453	0.386 0.533

\* Based on two-sided paired t-test of log-transformed outcomes



**Table 3:** Effect of food on glucose and GH concentrations in 16 healthy subjects (Data are mean $\pm$ SEM with median in brackets)

	<b>Fasting</b>	<b>Fed</b>	<b>P-value</b>
<b>ARD-07</b>			
<b>Glucose</b>			
<b>AUC(0-6h)</b> (mmol $\times$ h/l)	28.0 $\pm$ 0.7 (28.2)	29.4 $\pm$ 0.7 (29.1)	NS
<b>Cmax</b> (mmol/l)	5.2 $\pm$ 0.1 (5.3)	7.0 $\pm$ 0.3 (6.8)	< 0.001
<b>Tmax</b> (h)	1.5 $\pm$ 0.5 (0.63)	0.89 $\pm$ 0.12 (0.75)	NS
<b>Growth hormone</b>			
<b>AUC(0-6h)</b> (ng $\times$ h/ml)	47.50 $\pm$ 5.67 (41.65)	17.52 $\pm$ 4.69 (11.50)	< 0.001
<b>Cmax</b> (ng/ml)	37.13 $\pm$ 5.30 (33.97)	12.97 $\pm$ 3.47 (7.56)	0.001
<b>Tmax</b> (h)	0.94 $\pm$ 0.09 (1.00)	4.30 $\pm$ 0.86 (3.50)	0.001

## **9.4 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt dem Forschungsleiter der Studie, Herrn Prof. Dr. med. Christoph Beglinger, Chefarzt der Gastroenterologischen Abteilung des Universitätsspitals Basel, für seine tatkräftige Unterstützung während der wissenschaftlichen Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Giatgen Spinas herzlich für seine Unterstützung und Anregungen bedanken.

Grosse Unterstützung habe ich auch von den Mitarbeitern des Clinical Research Center des Kantonsspitals Basel erhalten, allen voran von Frau Luisa Baselgia Jeker, vielen Dank!

Meinen Eltern, Ursulina und Christian Casanova, möchte ich ganz herzlich für die Durchsicht der Arbeit danken. Sie haben mir mein Studium ermöglicht und stehen mir immer mit gutem Rat und grosszügiger Unterstützung auf meinem Lebensweg zur Seite.

Ein Dankeschön gebührt auch den Probanden für ihre geduldige und flexible Teilnahme an dieser Studie.

## 10. Curriculum vitae

**Name:** Anna Tina Casanova  
**Geburtsdatum:** 20.05.1984, geboren in Samedan GR  
**Bürgerort:** Ruschein GR  
**Nationalität:** Schweiz

### Ausbildung:

1991-1997	Primarschule in Herrliberg/ZH (1991-1992) und Scuol/GR (1993-1997)
1997-2003	Gymnasium am Hochalpinen Institut Ftan, Maturitätsabschluss (neue Matura MAR) im Juni 2003 mit Schwerpunktfach Italienisch, Ergänzungsfach Anwendungen der Mathematik
2003-2004	Zwischenjahr (Reisen und Sprach-Aufenthalte, Volontäreinsatz in Südamerika, Arbeitsstellen in Scuol und Zürich)
10/2004-07/2006	Grundstudium Medizin Universität Fribourg (1. und 2. Studienjahr)
ab 10/2006	klinisches Studium an der Universität Zürich (3. bis 6. Studienjahr) mit voraussichtlichem Abschluss im Herbst 2010